

УДК 632.3

И. М. Игнатьева, Е. В. Каримова

Всероссийский центр карантина растений ФГБУ ВНИИКР,
140150, Россия, Московская обл., г. Быково, ул. Пограничная 32,
babiraignirmi@ya.ru

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИОЗОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИХ ДИАГНОСТИКИ

Ключевые слова: молекулярные методы диагностики, латентная инфекция, полимеразная цепная реакция (ПЦР), штамм, праймер, тест-система.

В последние годы внимание к зернобобовым культурам увеличилось в связи с необходимостью ликвидации белковой недостаточности в питании и кормлении сельскохозяйственных животных.

Необходимость всестороннего анализа бактериозов зернобобовых культур, включающая в себя анализ вероятности проникновения их на территорию Российской Федерации с различными видами продукции из разных стран, анализ вероятности акклиматизации в конкретных регионах России с учетом специфики абиотических и биотических факторов, анализ вероятности разностроннего влияния на экономику России, состояние окружающей среды и социальную обстановку на ее территории, нацеливает на разработку современных методов диагностики зернобобовых культур. Актуальность данной темы в том, что РФ экспортирует зерно зернобобовых в разные страны, которые предъявляют фитосанитарные требования, среди которых отсутствие возбудителей бактериальных заболеваний в зерне зернобобовых на семенные цели.

Основные бактериальные болезни зернобобовых вызываются возбудителями ржаво-бурой пятнистости листьев фасоли *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (рис. 1, а), угловатой бактериальной пятнистости фасоли *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (рис. 1, б) и бактериального ожога фасоли *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (рис. 1, в).



Рис. 1. а – симптомы *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (фото слева, Harveson et al., 2015); б – симптомы *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (фото в центре, К. Науманна Ашерслебен, Германия); в – симптомы *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (фото справа, Говард Ф. Шварц, Bugwood.org)

Данные патогены вызывают снижение урожая и качества зерна зернобобовых культур и являются очень важными с точки зрения экономики.

Контроль бактериозов возможен при использовании свободных от возбудителя семян и соблюдении севооборота. Эффективные химические средства защиты в настоящее время отсутствуют [1]. Интродукция фитопатогенных бактерий в новые регионы может произойти с семенным материалом (главным образом фасоли и сои), зараженным бактериальной инфекцией в латентном состоянии, что может вызвать серьезные проблемы в производстве зернобобовых культур.

При современном распространении бактериозы имеют большое фитосанитарное значение для южной зоны Евразийского экономического союза и зон культивирования *Phasoleus spp.* Следует также отметить, что надо быть готовым к моменту включения бактериозов в список сигнального перечня Евразийского экономического союза, изучить материалы по обнаружению бактериозов, провести обследования и мониторинг посевов фасоли, сои и других зернобобовых культур на территории РФ, внедрить подходящие методы диагностики в работу аккредитованной лаборатории.

Наиболее эффективный метод борьбы с распространением заболевания – использование здоровых семян, сертифицированных на основе тщательных обследований вегетирующих растений и лабораторной экспертизы партий семян. Лучший способ защиты растений – ранняя диагностика патогена. Для этого необходимы комплексные высокочувствительные методы обнаружения и идентификации патогена в растениях.

Для диагностики бактериальных патогенов зернобобовых культур было описано множество процедур, но ни одна из них не является общепринятой. Еще двадцать лет назад контроль возбудителей зернобобовых культур был затруднен, и единственные практические методы управления болезнью были основаны на использовании семян, незараженных патогеном, подходящих практик возделывания и использования устойчивых культур. В то время для определения бактериальных штаммов широко использовались серологические и молекулярные исследования [2–4]. Однако фактически было трудно отличить патовары этих штаммов.

В настоящее время перспективным направлением идентификации патогена является анализ на основе ПЦР [5]. Быстрый и высокоспецифичный метод может быть использован как для выявления возбудителя в экстракте семян (с использованием предварительного выделения ДНК), так и для прямого анализа бактериальных смывов и идентификации суспензий чистых культур [6].

Исследование, основанное на анализе ПЦР, способствует установке новой, быстрой и достоверной диагностики. Также это может быть использовано при оценке уровня заражения растения-хозяина.

Сотрудники научных лабораторий ФГБУ «ВНИИКР» проводят разработку современных высокочувствительных методов выявления и идентификации возбудителей ржаво-бурой пятнистости листьев фасоли *S. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, угловатой бактериальной пятнистости фасоли *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* и бактериального ожога фасоли *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, что позволяет проводить лабораторную экспертизу подкарантинного материала при импорте его в РФ.

Существенное влияние на достоверность результатов диагностики оказывает выбор праймеров и оптимизация состава ПЦР-смеси. Различные наборы выделения ДНК характеризуются своим уровнем чувствительности. Диагностические тест-системы различаются по степени взаимодействия праймеров с реакционной смесью. Для корректной работы диагностического набора необходимо проводить валидацию тест-системы для определения аналитической чувствительности (рис. 2, а), аналитической специфичности, селективности, повторяемости и воспроизводимости. Важно также, чтобы тест-система была удобной для проведения стандартной лабораторной экспертизы, а приготовление реакционной смеси занимало как можно меньше времени.

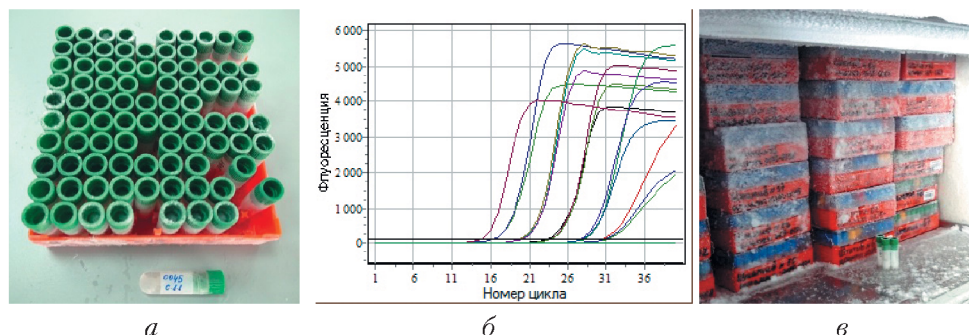


Рис. 2. а – результаты определения аналитической чувствительности тест-систем для идентификации фитопатогенных бактерий на примере *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; б – коллекция фитопатогенных бактерий ФГБУ «ВНИИКР», заложенных на длительное хранение методом криоконсервации (-70°C), размещение в морозильной камере (фото И. Игнатъевой ФГБУ «ВНИИКР»); в – коллекция фитопатогенных бактерий ФГБУ «ВНИИКР», заложенных на длительное хранение методом криоконсервации (-70°C), размещение в криостате (фото И. Игнатъевой ФГБУ «ВНИИКР»)

При проведении лабораторных валидационных испытаний нами используются штаммы из бактериальной коллекции ФГБУ «ВНИИКР», которая насчитывает более трехсот патогенных штаммов (табл. 1, рис. 2, б, в).

Таблица 1

Штаммы фитопатогенных бактерий, используемые в оценке аналитической специфичности тест-систем

п/н	Номер штамма	Название штамма
1	0010	<i>Ralstonia solanacearum</i>
2	0011	<i>Ralstonia solanacearum</i>
3	0028	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
4	0040	<i>Ralstonia solanacearum</i>
5	0041	<i>Ralstonia solanacearum</i>
6	0043	<i>Ochrobactrum</i> sp.

п/н	Номер штамма	Название штамма
7	0044	<i>Erwinia billingiae</i>
8	0045	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>
9	0046	<i>Pseudomonas congelans</i>
10	0047	<i>Enterobacter amnigenus</i>
11	0048	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
12	0049	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
13	0050	<i>Xilophilus ampelinus</i>
14	0092	<i>Acidovorax citrulli</i>
15	0109	<i>Erwinia piriflorinigrans</i>
16	0120	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>
17	0141	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
18	0142	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
19	0144	<i>Dickeya</i> sp.
20	0147	<i>Xanthomonas fragariae</i>
21	0148	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>
22	0149	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>
23	0172	<i>Erwinia amylovora</i>
24	0181	<i>Rahnella aquatilis</i>
25	0222	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
26	0226	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
27	0227	<i>Xanthomonas oryzae</i>
28	0306	<i>Xylella fastidiosa</i>

Всероссийский центр карантина растений ведет как аналитическую, так и практическую деятельность в направлении защиты растений и ранней диагностики фитопатогенов. В настоящий момент идет разработка методов диагностики для бактериальных фитопатогенов зернобобовых культур.

Список литературы

1. Бактериозы зернобобовых культур и меры борьбы с ними: метод. рекомендации / ред. В. А. Павлюшин СПб.: ВИЗР, 2006. 41 с.
2. Mohan S. K., Schaad N. W. An improved Agar Plating Assay for Detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P.s.pv.phaseolicola* in Contaminated Bean Seed // Phytopathology. 1987. Vol. 77. P. 139-1395.

3. Prosen D., Hatziloukas E., Schaad N. W., Panopoulos N. J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region // *Phytopathology*. 1993. Vol. 83. P. 965–970.
4. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts / N. W. Schaad, S. S. Cheong, S. Tamaki, E. Hatziloukas, N. J. Panopoulos // *Phytopathology*. 1995. Vol. 85. P. 243–248.
5. International Rules for Seed Testing. 7–023: Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris* (bean) seed. Validated Seed Health Testing Methods. 2018.
6. D'Avila Denardin N., Agostini V. A. Detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans* in common bean seeds. Departamento de Microbiologia e Fitopatologia, Universidade de Passo Fundo, Caixa Postal 611, 99001–970. Passo Fundo, RS, Brasil. 2013

УДК 578.85/.86+578.864

Ю. А. Шнейдер, О. Н. Морозова,
Е. В. Каримова, И. П. Смирнова²

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»,
140150, Россия, Быково, ул. Пограничная, 32,
yury.shneyder@mail.ru

²Медицинский факультет Медицинского института
Российского университета дружбы народов,
117198 Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА МОЗАИКИ ПЕПИНО В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ключевые слова: *Perino mosaic virus*, томат, ПЦР, ИФА.

Вирус мозаики пепино (*Perino mosaic virus*, *PerMV*), представитель семейства *Potexvirus*, вызывает снижение урожая и качество плодов томатов во всем мире. С момента первого обнаружения в 1980 г., *PerMV* широко распространен по всему миру. В 1999 г. он был впервые выявлен в Европе, а в настоящее время распространен в большинстве стран ЕОКЗР. В некоторых странах Европы вирусом заражено до 70% томатов закрытого грунта. Основные хозяева вируса – растения семейства пасленовые, главным образом томат и пепино. В настоящее время *PerMV* входит в список ограничено распространенных карантинных видов – А2 ЕОКЗР [1, 2].

Методы диагностики *PerMV* в настоящее время представлены достаточно широко. Для лабораторий доступны коммерческие тест-системы для ИФА (DSMZ (Германия), Neogen (Великобритания), Bioreba (Швейцария) и др.)